

## **Bacterias coliformes y otras bacterias de interés sanitario en larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1887 (Anura, Bufonidae) en Santa Fe (Argentina)**

Rafael C. LAJMANOVICH, Federico EMILIANI & Paola M. PELTZER

Instituto Nacional de Limnología (INALI, CONICET),  
José Macía 1933, Santo Tomé, Santa Fe (3016), Argentina  
[inali@arctide.edu.ar]

**This study was carried out to give a preliminary, quantitative description of gut bacteria of *Bufo arenarum* tadpoles. The results revealed that bacterial concentrations in larva intestines were higher than bacterial concentrations in water. The number of *Escherichia coli* revealed in the guts of larval *B. arenarum* represented 3 % of thermotolerant coliforms. Taxonomic entities of coliforms were composed by *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. In addition, species of *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Aeromonas* were found in these intestines.**

### INTRODUCCIÓN

Como se puede comprobar en la extensa compilación de MACKIE & WHITE (1997a-b), existe abundante información sobre enterobacterias en animales de sangre caliente, pero en mucho menor grado en animales de sangre fría.

Los estudios sobre la microbiología de los anuros se han desarrollado principalmente siguiendo dos líneas. Por un lado, se ha investigado el contenido intestinal (e.g., INGR, 1986; LAJMANOVICH & FERNÁNDEZ, 1995; LAJMANOVICH, 1997) y el rol potencial de los microorganismos en el intestino de las larvas (BJORNDAL, 1997). Por otro lado, otras líneas de estudio han considerado a los anfibios principalmente como reservorios de microorganismos patógenos para otros animales (HIRD et al., 1981, 1983) y para el hombre (TRUST & BARLETTI, 1974; TRUST et al., 1981; RAJENDRAN et al., 1998). Dentro de esta temática, se ha sugerido (GILDRICH & CIARKI, 1966) que la flora bacteriana en estos animales puede reflejar las condiciones bacteriológicas de su ambiente y, por lo tanto, ser un indicador potencial de polución. Esta hipótesis supone que los coliformes fecales no son habitantes normales de su intestino: solamente pasan en forma breve e inalterada por su tracto intestinal. Con respecto a las larvas de anuros, la información bacteriológica existente está limitada a aspectos cualitativos de bacterias de interés sanitario (BJORNDAL, 1997); no se ha encontrado informa-

ción cuantitativa (sobre cualquier tipo de bacterias). Sin embargo, el significado sanitario de las bacterias coliformes no solamente está determinado por la información sobre sus posibles fuentes o reservorios sino, además, por el conocimiento de su distribución cuantitativa (GELDREICH et al., 1964).

Por eso, nuestro objetivo fue realizar una primera descripción cuantitativa de las bacterias de interés sanitario en el intestino de las larvas de *Bufo arenarum*; además, nos propusimos comparar sus concentraciones con las de su medio ambiente para establecer si existe un fenómeno de concentración microbiana. El presente estudio forma parte de un proyecto sobre la distribución de estas bacterias en diferentes organismos acuáticos (peces, almejas, rizósfera de plantas flotantes, etc.).

### MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de agua y de larvas de *Bufo arenarum* se recolectaron en zanjones colectores de aguas pluviales. Estos canales están situados en la periferia de la ciudad de Santo Tome, provincia de Santa Fe, Argentina (31°39'59"S, 60°45'20"O). La vegetación de los márgenes estaba compuesta principalmente por *Alternanthera philoxeroides*, *Cynodon dactylon*, *Bromus* sp. y *Ludwigia* sp.; no se detectó la presencia de peces.

Las muestras de agua para bacteriología se recolectaron en frascos de vidrio estériles (500 ml) y se almacenaron a 3-6°C durante 3 h. antes de los análisis. Por otra parte, se colectaron 125 larvas de *Bufo arenarum* con un copo de nylon, con poros de 2 mm. Las larvas se almacenaron a la misma temperatura, cada larva fue pesada y medida: el peso medio fue de 0.31 g ( $s = 0.06$ ), la longitud promedio (hocico cloaca) de 11.8 mm ( $s = 1.14$ ). El estadio más representativo de desarrollo resultó 37 (de acuerdo a la tabla de GOSNIR, 1960). En la colección Herpetológica del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino (Zoología Vertebrados) de la ciudad de Santa Fe (Argentina) se conserva un lote de referencia de 13 ejemplares (MFA-ZV-H 691) que formaban parte de la cohorte utilizada en este estudio.

Los intestinos fueron macerados en un mortero estéril, se utilizaron 100 g (25.4 % peso seco, relación p/v = 1/25) del macerado para realizar las diluciones destinadas al análisis bacteriológico.

Para el recuento de *Escherichia coli* y coliformes termotolerantes se utilizaron las placas rehidratables "PetriFilm<sup>TM</sup> EC" (de 3M). Las placas se colocaron en bolsas estériles a prueba de agua ("Whirl-Pack<sup>TM</sup>", de Nasco) e incubadas en baño termostático 44.5 ± 0.2°C durante 24 h (EMILIANI & LAJMANOVIC H., 1998). Para la evaluación del número de unidades formadoras de colonias (UFC) se utilizó el medio "Yeast Peptone agar/25" (FONDEL, 1969). De acuerdo con la división de las bacterias en grupos eco-trofoicos, el medio usado evalúa el número de UFC mesotróficas (EMILIANI, 1984). Las cajas de Petri fueron sembradas por el método de la triple capa (EMILIANI & DUCI, 1985), con cinco repeticiones por cada dilución (1/1000 a 1/1000000) e incubadas a 20°C. Las lecturas se hicieron periódicamente hasta que el número de colonias fue constante (lo que ocurrió en 15 días). El número de Coliformes Totales, Streptococos Fecales y *Pseudomonas aeruginosa* fue determinado por la técnica del número más probable (NMP), según APHA (1989). El número de *Vibrio cholerae*, de acuerdo

con BOCKEMUHL et al. (1986). Además, se seleccionaron cepas de Coliformes Fecales y vibrios para identificarlos bioquímicamente con el sistema "API 20E" (de bioMérieux, Francia) y el programa para computadora de taxonomía numérica "APILAB plus" de la misma empresa (ANÓNIMO, 1998a).

Para estimar si las diferencias entre cada par de recuentos realizados por el método del número más probable (NMP) eran estadísticamente significativas, se utilizó la prueba aconsejada por ORMEROD et al. (1982). La prueba se basa en el error del método y se usa para confirmar o rechazar la hipótesis nula que dos resultados ( $x_1$  y  $x_2$ ) provienen de poblaciones con medias idénticas, para ello se calculó el estadístico  $z = (\log \text{NMP}_1 - \log \text{NMP}_2) / 0.58 \sqrt{n}$ , donde  $n$  = número de repeticiones por dilución. Para estimar si las diferencias entre cada par de recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) eran estadísticamente significativas, se utilizó el test  $t$  de Student, de acuerdo con PARKINSON et al. (1971). Para determinar la significancia de los estadísticos  $t$  y  $z$  se usó el programa *GraphPad StatMate* (ANÓNIMO, 1998b).

## RESULTADOS

Los resultados (tab. 1) muestran que el número de bacterias, especialmente las del grupo coliforme, es varias veces mayor en los intestinos de las larvas que en su ambiente; aunque las diferencias entre las concentraciones *Streptococcus Fecales* y *V. cholerae*, no resultaron estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ).

El número de Coliformes Totales se aproxima a los valores más altos encontrados en peces por GILDREICH & CLARKE (1966), e inferior al encontrado en los diversos insectos estudiados por GELDRICH et al. (1964). Sin embargo, el número de Coliformes Fecales en las larvas resultó mayor que el encontrado en peces y en insectos. El número de *Streptococcus Fecales*, por lo contrario, resultó menor que los citados para intestinos de peces e insectos.

Además de *Escherichia coli*, las principales especies integrantes del grupo coliforme resultaron ser: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* (como así también en las muestras de agua). Estas especies también fueron encontradas por HIRD et al. (1983) en larvas de *Rana pipiens*. Además de enterobacterias, en el intestino de las larvas encontramos especies de *Pseudomonas* y de *Vibrio* (al igual que RAJLDRADAN et al., 1998, en *Rana hexadactyla* de la India). Por otra parte, aislamos especies de *Aeromonas salmonicida* y, al igual que otros autores (HIRD et al., 1981 y 1983 en intestinos de larvas de *Rana pipiens*), encontramos *Aeromonas hydrophila*. Esta bacteria fue señalada como posible responsable de la declinación de poblaciones de *Rana pipiens* en algunas regiones de Estados Unidos (GIBBS et al., 1971).

## DISCUSIÓN

Como se sabe (ALLAN & EDIBERG, 1997), *Escherichia coli* es de distribución universal en los intestinos de animales de sangre caliente, con densidades desde  $10^3$  hasta  $10^7$  por gramo, lo cual representa del 90% al 100% del total de coliformes termotolerantes. Si bien las

Tabla 1. - Número de bacterias en el tracto digestivo de larvas de *Bufo arenarum* y en el agua del ambiente. UFC, unidades formadoras de colonias; NMP: número más probable.

	Número de bacterias			
	Larvas (L)	Agua (A)	L/A	P
Bacterias viables cultivables (UFC/100 ml)	$392 \times 10^8$	$430 \times 10^5$	912	0.0001
Coliformes totales (NMP/100 ml)	$230 \times 10^7$	$80 \times 10^3$	28750	0.0006
Coliformes fecales (UFC/100 ml)	$193 \times 10^6$	$28.7 \times 10^3$	6725	0.0001
Streptococos fecales (NMP/100 ml)	$50 \times 10^3$	$9.0 \times 10^3$	5.5	0.5775
<i>Escherichia coli</i> (UFC/100 ml)	$5.33 \times 10^6$	$3.0 \times 10^3$	1777	0.0001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/100 ml)	$17.5 \times 10^3$	30	583	0.0320
<i>Vibrio cholerae</i> (NMP/100 ml)	400	30	13.3	0.3830

concentraciones de *E. coli* en larvas de *Bufo arenarum* resultaron altas (tab. 1), solamente representaron el 3 % de los Coliformes Fecales. RENNIE et al (1982) y NIEMI (1985) señalaron que los porcentajes de *Klebsiella* y *Enterobacter* son más altos en aguas residuales ricas en carbono y en la rizósfera de las plantas. Dada la amplia relación C/N, estos ambientes resultan favorables para las enterobacterias fijadoras de  $N_2$ . Probablemente, la predominancia de *Klebsiella* y *Enterobacter* (que son especies fijadoras de  $N_2$ ) en el grupo de los Coliformes Fecales, se deba a la misma razón.

No es extraño el hallazgo de especies de *Aeromonas* ni de *Vibrio*, pues tienen una amplia distribución en las aguas naturales, incluso en el zooplancton y en las rizósfera de los camalotes (*Eichhornia crassipes*) (ALONSO et al., 1996; EMILIANI et al., 1997).

La mayor concentración de bacterias en los intestinos de las larvas con respecto a su ambiente puede deberse a que las bacterias se concentran con el alimento ingerido por lo cual habría, al igual que en peces (NIEMI, 1985), una relación entre el número de bacterias en el tracto digestivo de las larvas y el grado de contaminación de los alimentos y del agua. Otra posible razón del mayor recuento en larvas podría ser debido a la multiplicación bacteriana en su intestino, tal como DEL RIO-RODRIGUEZ et al (1997) verificaron en peces, para *E. coli*. Sin embargo, debido a las pocas horas que el alimento permanece en el tracto digestivo de las larvas de anuros (BJØRNDAL, 1996), tal posibilidad es poco probable.

Otra explicación estaría relacionada con una eventual selección o preferencia de las larvas por algún tipo de microorganismo. Esta bien documentado el hecho de que las colonias bacterianas pueden ser químicamente atractivas, repulsivas o neutras para la microfauna (protozoos, cladóceros, nematodos, larvas de insectos, etc.) (RHILINHEIMER, 1994; GRIFFITHS & BARDGETT, 1997), pero no hemos encontrado referencias con respecto a larvas de anuros. Las bacterias en el ambiente acuático pueden estar libres o adheridas (EMILIANI, 1984), en este último caso, forman microcolonias sobre partículas, especialmente sobre algas (RHILINHEIMER, 1994). Es probable que las larvas de anuros realicen una mayor ingesta de bacterias que colonizan partículas (algas o detritus) y que, por lo tanto, se pueda comprobar un mayor número de esas bacterias en su tracto intestinal. En este trabajo, verificamos una significativa

acumulación de enterobacterias (tab. 1,  $P < 0,05$ ); éstas, posiblemente, se encontraban colonizando partículas o formando biofilms (su capacidad de hacerlo es conocida: PACKER et al, 1997). Las demás bacterias, que no se concentraron en forma significativa (tab. 1,  $P > 0,05$ ) en el intestino de las larvas, podrían haber estado en forma de vida libre (fase planctónica). No discriminamos entre bacterias libres y adheridas en las muestras de agua, pero en trabajos anteriores (EMILIANI, 1984), encontramos que la mayor parte de la población bacteriana (61 %,  $V = 38,7$  %) está adherida al seston.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue brindar una descripción cuantitativa preliminar sobre bacterias intestinales en larvas de *Bufo arenarum*. Los resultados mostraron que el número de bacterias es varias veces mayor en los intestinos de los renacuajos que en su ambiente. El número de *Escherichia coli* en intestinos larvales de *B. arenarum* representó un 3 % de los coliformes termotolerantes. Las entidades taxonómicas de coliformes fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*. Además, se encontraron especies de *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Aeromonas*.

## AGRADECIMIENTOS

A la Bioq Estella M. González de Páira por su colaboración en los trabajos de laboratorio. A los revisores de la revista *Ahyes* y al editor Dr. Karen R. Lips, por las observaciones, comentarios y sugerencias.

## LITERATURA CITADA

- ANONIMO 1998a. APILAB Plus™ version 3.3.3. Licensed to Federico Emiliani, Serial Number 40408, Lot. 298 090. Copyright© by bioMérieux, Marcy-l'Etoile.
- 1998b. GraphPad StatMate™ version 1.01. Licensed to Federico Emiliani, Serial Number GTA 50533-353. Copyright© by GraphPad Software Inc., San Diego, California.
- ALLIN, M. J. & EDLBERG, S. C. 1997. The public health significance of bacterial indicators in drinking water. In: D. KAY & C. FIRCHER (ed.), *Coliforms and E. coli: problem or solution?* Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 176-188.
- ALONSO, J. L., AMOROS, I. & ALONSO, M. A., 1996. Differential susceptibility of aeromonads and coliforms to ceftiofloxacin. *J. appl. environ. Microbiol.*, **62** (6): 1885-1888.
- APHA. 1989. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 17th ed. Washington, American Public Health Association: 1-874.
- BJORNDAAL, K. A., 1997. Fermentation in reptiles and amphibians. In: R. J. MACKIE & B. A. WHITE (ed.) *Gastrointestinal microbiology*, Vol. 1, *Gastrointestinal ecosystems and fermentations*, New York, Chapman & Hall, 199-230.
- BOCKMUEHL, J., RUCH, K., WOLLERS, B., ALIEMIC, V., ALIEMIC, S. & WOKATSCHEL, R., 1986. Seasonal distribution of facultatively enteropathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*) in the freshwater of the Elbe River at Hamburg. *J. appl. Bacteriol.*, **60** (3): 435-442.



- DEL RIO RODRIGUEZ, R. E., INGLIS, B. & MILLAR, S. D., 1997 Survival of *Escherichia coli* in the intestine of fish. *Aquacult. Rev.*, **28** (4), 257-264.
- EMILIANI, F., 1984 - Oligotrophic bacteria seasonal fluctuations and correlations with environmental variables (Middle Paraná river, Argentina). *Hydrobiologia*, **111** (1): 31-36
- EMILIANI, F. & DLCE, J. A., 1985 Rehabilitation of the pour plate method for viable counts of freshwater bacteria. *Rev. lat-amer. Microbiol.*, **27** (4), 225-230
- EMILIANI, F., GONZÁLEZ DE PAIRA, S. M. & LAJMANOVICH, R. C., 1997 Frecuencia de aislamiento de *Vibrio cholerae* en aguas y en plancton de la cuenca inferior del Río Salado (Santa Fe, Argentina) *Rev. arg. Microbiol.*, **29** (4): 195-201.
- EMILIANI, F. & LAJMANOVICH, R. C., 1998 Evaluación de las placas "Petrifilm™ E coli" para el recuento de coliformes termotolerantes en aguas recreacionales de Santa Fe (Argentina) *FAB-CIB (Rev. Fac. Biog. Cienc. Biol.)*, **2** (1) 99-105
- FONDEN, R., 1969 - Heterotrophic bacteria in Lake Mälaren and Lake Hjalmarén. *Oikos*, **20** (2) 344-372
- GELDRICH, E. E. & CLARKE, N. A., 1966 Bacterial pollution indicators in the intestinal tract of freshwater fish. *Appl. Microbiol.*, **14** (3), 429-437.
- GELDRICH, E. E., KENNER, B. A. & KABELER, P. W., 1964 Occurrence of coliforms, fecal coliforms, and streptococcus on vegetation and insects. *Appl. Microbiol.*, **12** (1): 63-69
- GIBBS, E. L., NACE, G. W. & EMMONS, M. B., 1971 The live frog is almost dead. *BioScience*, **21** 1027-1034
- GOSNER, K. L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on their identification. *Herpetologica*, **16** (2), 183-190
- GRIFFITHS, B. S. & BARDGETT, R. D., 1997 Interactions between microbe-feeding invertebrates and soil microorganisms. In J. D. LITSAS, J. T. TREVORS & E. M. H. WELLINGTON (ed.). *Modern soil microbiology*, New York, M. Dekker: 165-182.
- HIRD, D. W., DIESCH, S. L., MCKINNELL, R. G., GORHAM, E., MARTIN, F. B., KURTZ, S. W. & DLBROVOLNY, C., 1981 *Aeromonas hydrophila* in wild-caught frogs and tadpoles (*Rana pipiens*) in Minnesota. *Lab. Anim. Sci.*, **31** (2), 166-169.
- HIRD, D. W., DIESCH, S. L., MCKINNELL, R. G., GORHAM, E., MARTIN, F. B., MFADOWS, C. A. & GASTOROWSKI, M., 1983 Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). *Appl. environ. Microbiol.*, **46** (6): 1423-1425
- INGER, R. F., 1986 - Diets of tadpoles living in a Bornean rain forest. *Alytes*, **5** (4) 153-164
- LAJMANOVICH, R. C., 1997 Alimentación de larvas de anuros en ambientes temporales del sistema del Río Paraná, Argentina. *Doñana Acta Vertebrata*, **24** (1-2): 191-202
- LAJMANOVICH, R. C. & FERNÁNDEZ, V. C., 1995 Alimentación de larvas de *Bufo arenarum* Hensel, 1867 (Amphibia, Bufonidae) en ambientes del Río Paraná. *Bol. Mus. nat. Hist. Chile*, **45** 7-18
- MACKIL, R. I. & WHITE, B. A., (ed.), 1997a *Gastrointestinal microbiology* Vol 1 *Gastrointestinal ecosystems and fermentations*, New York, Chapman & Hall: 1-660
- 1997b - *Gastrointestinal microbiology* Vol 2 *Gastrointestinal microbes and host interactions* New York, Chapman & Hall: 1-680.
- NIBMI, M., 1985 Fecal indicator bacteria at freshwater rainbow trout (*Salmo gairdneri*) farms. *Pub. Water Res. Inst., Helsinki*, **64** 1-50
- ORMLEROD, K., BONDE, G. J. & KRISTENSEN, K. K., 1982 - Bacteriological examination. In M. J. STUESS (ed.), *Examination of water for pollution control. A reference handbook*, Vol 3, *Biological, bacteriological and virological examination*, Oxford, Pergamon Press: 273-461
- PACKER, P. J., HOLT, D. M., COULBOURNE, I. S. & KELVIL, C. W., 1997 Does *Klebsiella oxytoca* grow in the biofilm of water distribution systems? In D. KAY & C. FIRCHER (ed.) *Coliforms and E. coli problem or solution?*, Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 189-194
- PARKINSON, D., GRAY, T. R. & WILLIAMS, S. T., 1971 *Methods for studying the ecology of soil microorganisms*. Oxford, Blackwell, IBP Handbook N°19: 1-116
- RAJENDRAN, P., JAINAMBOO, K. S. M. & THYAGARAJAN, S. P., 1998 A study on the green frog (*Rana hexadactyla*) in relation to the environmental dissemination of enteric human pathogens. *J. environ. Biol.*, **19** (1) 73-78
- RENNIE, R. J., FREITAS, J. R. DE, RUSCHLE, P. & VÖSE, P. B., 1982 Isolation and identification of N-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.) *Canad. J. Microbiol.*, **28** (5) 462-467
- RHEINHEIMER, G., 1994 *Aquatic microbiology* 4<sup>th</sup> ed. Chichester, J. Wiley & Sons: 1-364

- TRUST, T. J. & BARTLETT, K. H., 1974. - Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes. *Appl. Microbiol.*, **28** (1): 35-40.
- TRUST, T. J., BARTLETT, K. H. & LIOR, H., 1981. - Importation of salmonellae with aquarium species. *Can. J. Microbiol.*, **27** (5): 500-504.

*Corresponding editor:* Karen R. Lips.